Aus dem Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

# Untersuchungen über die Wirksamkeit einiger antimikrobieller Zusätze in Augentropfen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Günter Doll, Medizinalassistent
aus Berlin

1962

Aus dem Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

---

# UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKSAMKEIT EINIGER ANTIMIKROBIELLER ZUSÄTZE IN AUGENTROPFEN

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Günter Doll, Medizinalassistent

aus Berlin

| | |
|---|---|
| Dekan: | Professor Dr. med., Dr. med. dent. Ewald Harndt |
| Referent: | Professor Dr. med. Bernhard Schmidt |
| Korreferent: | Priv. Doz. Dr. Kurt-Eberhard Kleberger |

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 10. 9. 1962

# INHALTSÜBERSICHT

A. EINLEITUNG und LITERATURÜBERSICHT 5

B. EIGENE UNTERSUCHUNGEN 9

I. Material und allgemeine Methoden 9

1. Bakterienstämme 9

2. Nährböden 9

3. Sterilitätsprüfungen 10

4. Bereitung der Bakterien- und Sporensuspension 10

5. Augenlösungen und antibakterielle Substanzen 10

6. pH-Messungen 11

7. Filtergeräte 11

II. Ergebnisse 12

1. Verhalten der Keimzahlen in künstlich infizierten Augentropfen ohne Zusatz antimikrobieller Stoffe 12

2. Untersuchungen über die bakteriostatische und bakterizide Aktivität einiger quartärer Ammoniumverbindungen und organischer Quecksilberpräparate in Augentropfen 15

a) Membranfiltermethode 15

b) Spezifische Enthemmung 15

c) Versuche in vivo 16

d) Sterilitätsprüfung von Augentropfen aus im Gebrauch befindlichen Flaschen 16

3. Untersuchungen über die Stabilität antimikrobieller Zusätze bei der Herstellung von Augentropfen 27

III. Diskussion 30

C. ZUSAMMENFASSUNG 37

D. SCHRIFTTUM 39

## A. EINLEITUNG und LITERATURÜBERSICHT

Zur Verhütung bakterieller Verunreinigungen in Augentropfen ist der Zusatz antimikrobieller Stoffe allgemein üblich geworden. Vielfach ist dieses Verfahren in ausländischen Arzneibüchern für Mehrdosenbehälter bereits vorgeschrieben, soweit die Lösungen nicht von sich aus eine deutliche entwicklungshemmende Wirkung auf Mikroben besitzen.

Vergleichende Untersuchungen über Konservierungsmittel, ihre Wirksamkeit und Eignung als Zusätze in Augentropfen liegen von verschiedenen Autoren vor. Richtungsweisend waren die Arbeiten von Theodore und Feinstein (57), Lawrence (30) sowie von Klein und Mitarbeitern (26).

Die am meisten empfohlenen und heute gebräuchlichsten antimikrobiellen Zusätze in Augentropfen sind quartäre Ammoniumverbindungen und organische Quecksilberpräparate, über deren rasche Wirksamkeit und völlige Unschädlichkeit von vielen Autoren berichtet worden ist (Heller und Mitarbeiter (16), Hind und Goyan (19), Hind und Szekely (20), Richter (46), Ridley (47) ). Hinweise auf einzelne Präparate und ihre chemische Zusammensetzung gibt die Tabelle 1.

Wegen seiner Gefährlichkeit, seines häufigen Vorkommens in Augenlösungen (McCulloch (37)) und der geringen Empfindlichkeit gegenüber vielen chemischen Desinfektionsmitteln ist Pseudomonas aeruginosa (= Ps. pyozyanea) der wichtigste Testkeim zur Bestimmung der Wirksamkeit antimikrobieller Zusätze in Augentropfen.

Frith und Wright (11) konnten schon bei der ersten Entnahme nach 15 Minuten aus einer mit Pyozyaneuskeimen künstlich infizierten Centrimide-Lösung (Cetyltrimethylammoniumbromid) 1 : 20 000 keine Impfkeime mehr anzüchten. Nach Lawrence (30) wird Ps. aeruginosa von Phenylmercurinitrat 1 : 10 000 innerhalb 30 bis 60 Minuten abgetötet. Diese Angaben konnten von anderen Autoren bestätigt werden (u.a. 16, 46, 38). Für die übrigen in Tabelle 1 erwähnten Präparate der jeweiligen Stoffgruppen ergaben sich entsprechende Ergebnisse.

Tabelle 1

Übersicht über gebräuchliche antimikrobielle Zusätze in Augentropfen aus der Reihe der quartären Ammoniumverbindungen und organischen Quecksilberpräparate.

Quartäre Ammoniumverbindungen

| Präparat | chemische Zusammensetzung | | empfohlene Konzentration |
|---|---|---|---|
| Benzalkoniumchlorid USP | Alkyldimethylbenzyl-ammoniumchlorid | R $(CH_3)_2C_6H_5CH_2N$ Cl<br>R = $C_8H_{17}$ bis $C_{18}H_{37}$ | 1:5 000 bis 1:20 000<br>(30) (26) |
| Benzalkoniumchlorid-Winzer (Tetraseptan WZ) | Benzylcetyldimethyl-ammoniumchlorid | R $(CH_3)_2C_6H_5CH_2N$ Cl<br>R = $C_{16}H_{33}$ | 1 : 20 000 bis 1 : 50 000<br>(46) (56) |
| Centrimide | Cetyltrimethyl-ammoniumbromid | R $(CH_3)_3N$ Br<br>R = $C_{16}H_{33}$ | 1 : 20 000<br>(11) |

Organische Quecksilberpräparate

| Präparat | chemische Zusammensetzung | | empfohlene Konzentration |
|---|---|---|---|
| Phenylmercuriborat (Merfen WZ) | Phenylmercuriborat, basisch | $C_6H_5HgOB(OH)_2$ · $C_6H_5HgOH$<br>MGew: 633, 2440 (Thomann (58)) | 1: 50 000 bis 1: 100 000<br>(39) (56) |
| Phenylmercurinitrat | Phenylmercurinitrat, | etwa $C_6H_5HgNO_3$ · $C_6H_5HgOH$<br>MGew: etwa 653 (Jaenicke (22)) | 1 : 10 000 bis 1 : 100 000<br>(30) (26) |

Sowohl Frith und Wright als auch Lawrence verwandten wirksame enthemmende Zusätze zum Subkulturmedium.

Es ist nämlich bekannt, daß die organischen Quecksilber- und auch die quartären Ammoniumverbindungen stark bakteriostatisch wirken. Daher muß bei Untersuchungen dieser Desinfektionsmittel das Problem der Enthemmung besonders beachtet werden, um Selbsttäuschungen durch nur scheinbar negative Ergebnisse zu verhindern. Quecksilberpräparate können durch Sulfide, Mercaptoverbindungen oder Serum inaktiviert werden (Phillips und Warshowski (43) ), quartäre Ammoniumsalze durch anionenaktive Netzmittel, wie Seife (Domagk (7) ), Lecithin und andere Phospholipide (Quisno, Gibby und Foter (44) ) oder physikalisch durch Aktivkohle (Rahn und van Eseltine (45) ). Nicht ionogene Netzmittel wie Tween 80, das Quisno und Mitarbeiter (44) als Lösungsvermittler für Lecithin empfohlen haben, wirken nach Erlandson und Lawrence (9) gegenüber manchen quartären Ammoniumverbindungen ebenfalls abschwächend. Entsprechende Angaben finden sich auch in den "Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel", herausgegeben von der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (60).

Es sind jedoch auch Zweifel an der raschen Wirksamkeit der quartären Ammoniumverbindungen und organischen Quecksilberpräparate erhoben worden. Riegelman, Vaughan und Okumoto (48, 49) haben noch nach einer Einwirkungszeit von einigen Tagen aus Benzalkoniumchlorid USP (1:5000) und Phenylmercurinitrat (1:10000) lebende Pyozyaneusbakterien isolieren können, als sie Proben der Lösungen Kaninchen intracorneal injizierten. Ähnliche Ergebnisse erzielten sie bei ihren Versuchen in vitro, zu denen sie als Nährmedium eine Tween-80-Lecithin-Thioglykolat-Brühe verwandten. Anderson und Stock (1) prüften die Wirksamkeit von Benzalkoniumchlorid, Centrimide (beide 1:20 000 verdünnt) und Phenylmercurinitrat (1:10 000) gegen drei verschiedene Pyozyaneusstämme bis zu Einwirkungszeiten von einer Stunde. Bei allen Entnahmen wurden überlebende Testkeime nachgewiesen. Die Autoren verwandten zur Ausschaltung der antibakteriellen Nachwirkung der quartären Ammonium-

verbindungen Eigelb (5 %), wie dies von Davies und Mitarbeitern (4) zur Inaktivierung von Hexachlorophen empfohlen worden ist. Bei der Testung organischer Hg-Präparate setzten sie dem Nährboden 0,1 % Natriumthioglykolat zu.

Die starken Abweichungen dieser Ergebnisse von denen der zu Beginn genannten Autoren machen den Versuch einer Klärung notwendig. Denn gerade die Kenntnis der Abtötungszeit ist für den Ophthalmologen von praktischem Wert, da sie - unter Berücksichtigung eines Sicherheitswertes - den Zeitpunkt einer gefahrlosen Wiederverwendung bakteriell infizierter Augentropfen angibt ( B. Schmidt (52) ).

Es ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Wirksamkeit einiger quartärer Ammoniumverbindungen und organischer Quecksilberpräparate als antibakterielle Zusätze in Augentropfen festzustellen. Bei bestimmten Konzentrationen soll die zur Abtötung eingeimpfter Bakterien notwendige Einwirkungszeit ermittelt werden.

Daneben wird nachgeprüft, inwieweit diese Mittel der notwendigen Forderung nach Stabilität der antibakteriellen Eigenschaft bei der Herstellung von Augentropfen entsprechen.

Außerdem soll das Verhalten einiger pathogener Keime in verschiedenen Augenlösungen untersucht werden. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, ob sich diese Keime in Lösungen, die keinen antibakteriellen Zusatz enthalten, vermehren können.

## B. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

### I. Material und allgemeine Methoden:

#### 1. Bakterienstämme:

a) Pseudomonas aeruginosa (73 Stämme):

Stamm I und II waren Laborstämme, Stamm III war frisch aus einer Wunde isoliert, Stamm IV stammte aus dem Urin eines Cystopyelitiskranken. Die Stämme III und IV wurden freundlicherweise vom Medizinaluntersuchungsamt I Berlin zur Verfügung gestellt. Weitere 69 Ps. aeruginosa-Stämme wurden untersucht, die in den Jahren 1957-1961 überwiegend aus Fluß- und Abwasser vom Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Freien Universität Berlin isoliert worden sind. Die übrigen Stämme wurden der Stammsammlung des Instituts entnommen.

b) Escherichia coli: Laborstamm

c) Staphylococcus aureus SG 511 Berlin: Laborstamm

d) Bacillus subtilis: Laborstamm

#### 2. Nährböden:

Die normale Nährbouillon setzte sich zusammen aus

| | |
|---|---|
| Fleischextrakt | 10,0 |
| Pepton (tryptisch verdaut) | 10,0 |
| Kochsalz | 3,0 |
| sek. Natriumphosphat nach Sörensen ($Na_2HPO_4 + 12\ H_2O$) | 2,0 |
| Wasser | ad 1000,0 |

Für besondere Untersuchungen wurden dieser Nährbouillon vor dem Autoklavieren verschiedene Substanzen zugefügt, die bei der Besprechung der Ergebnisse abgehandelt werden.

Die Herstellung von Nähragar erfolgte nach der gleichen Rezeptur unter Zusatz von 2 % Agar.

3. Sterilitätsprüfungen:

Es wurden je zwei Röhrchen mit Nährbouillon und Leberbouillon (vor Gebrauch 1/2 Stunde erhitzt), ein Bierwürzröhrchen und zwei Agarschalen mit einem Tropfen (etwa 0,045 ml) der zu untersuchenden Lösung beimpft. Enthielt die Lösung bakteriostatisch wirksame Substanzen, so wurden zusätzlich Nährlösungen, die einen enthemmenden Zusatz enthielten (II 2b), beimpft und der Effekt der Enthemmung durch Inokulation eines Tropfens einer 1 : 100 000 verdünnten Staphylokokken-Bouillonkultur in unbewachsene Röhrchen kontrolliert. Die Bebrütung erfolgte 14 Tage bei 37 und 22° C.

4. Bereitung der Bakterien- und Sporensuspension für die Suspensionsversuche:

Zur Gewinnung der Bakteriensuspension wurden von festen Nährböden Kulturen in 10 ml Nährbouillon angelegt und 18 Stunden bebrütet. Handelte es sich um Kulturen von Ps. aeruginosa, so wurden sie mit Glasperlen eine Minute geschüttelt und so in eine gleichmäßige Suspension übergeführt. Es wurden gut versporte Kulturen von Bacillus subtilis (Agarschale) mit 5 ml Kochsalzlösung abgeschwemmt, durch Glaswolle filtriert und 60 Minuten lang im Wasserbad auf 60° C erhitzt.

5. Augenlösungen und antibakterielle Substanzen:

Die Arzneimittelsubstanzen wurden z. T. freundlicherweise von der Apotheke des Städtischen Rudolf-Virchow-Krankenhauses Berlin +) zur Verfügung gestellt, z. T. im Handel bezogen. Die antibakteriellen Substanzen bzw. deren Stammlösungen verdanken wir der freundlichen Unterstützung durch die Hersteller (Fa. Winzer, Konstanz; Fa. Schuchard, München; Fa. Zyma-Blaes, München).

---

+) Dem Leiter der Apotheke, Herrn Oberapotheker Dr. Wittenhagen, bin ich hierfür und für zahlreiche fachliche Anregungen zu besonderem Dank verpflichtet.

Die Lösungen wurden selbst unter aseptischen Bedingungen hergestellt. Die Arzneimittelsubstanzen waren dabei nicht sterilisiert. Die Augenlösungen ohne Zusatz antimikrobieller Stoffe wurden durch Seitzfilter bakterienfrei filtriert. Die übrigen Lösungen, denen Konservierungsmittel zugefügt worden waren, erwiesen sich stets als keimfrei, wenn die Sterilitätsprüfung etwa eine Stunde nach Herstellung durchgeführt wurde.

6. pH-Messungen:

Die pH-Werte der Testlösungen wurden potentiometrisch bestimmt (pH-Meter E 150 A der Firma Metrohm AG, Herisau, Schweiz). Bei der Herstellung der Nährböden erfolgte die pH-Messung mit Spezial-Indikatorpapier "Merck" bis auf diejenigen, die Tween 80 enthielten und potentiometrisch kontrolliert wurden.

7. Filtergeräte:

a) Asbestfilter der Seitzwerke GmbH, Kreuznach (Rhld); Laboratoriumsfilter "Seitz EK" Gr. 6 nach Uhlenhuth.

b) Membranfilter der Sartoriuswerke AG und Co., Göttingen; Auflage: Coli-5-Filterscheibe (vor Gebrauch eine halbe Stunde im Dampftopf erhitzt)

c) Ganzglasbakterienfilter der Fa. Schott und Gen., Mainz, Gerät 3 G 5

d) Berkefeldfilterkerze

Genauere Angaben über diese Filtergeräte finden sich bei B. Schmidt und F. Reichert (54).

Die Filtration durch Seitzfilter erfolgte durch Preßluftdruck, in den übrigen Fällen mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe.

Spezielle Versuchsanordnungen werden des besseren Verständnisses wegen im Zusammenhang mit den Ergebnissen abgehandelt.

## II. Ergebnisse:

### 1. Verhalten der Keimzahlen in künstlich infizierten Augentropfen ohne Zusatz antimikrobieller Stoffe

Versuchsanordnung:

18-stündige Bouillonkulturen der Testkeime, die etwa $10^8$ Keime/ml enthielten, wurden im Verhältnis 1 : 1 000 mit sterilisiertem Aqua dest. verdünnt und 5 ml der betreffenden Lösungen mit einem Tropfen dieser Keimsuspension beimpft, so daß sich bei Versuchsbeginn Keimzahlen von etwa 1 500/ml ergaben. Nach 15, 22, 50, 75 und teilweise auch 100 Stunden wurden logarithmische Verdünnungsreihen bis $10^{-6}$ in Peptonlösung angefertigt und von jeder Verdünnung 0,1 ml in zwei sterile Petrischalen gegeben, die dann mit etwa 15 ml handwarmem Agar gefüllt wurden. Auf gute Vermischung wurde geachtet. Die Keimzählung erfolgte gewöhnlich auf den Platten, die etwa 30-300 Bakterienkolonien enthielten, nach 48-stündiger Bebrütung bei 37° C. Das arithmetische Mittel der gezählten Kolonien, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor, ergab die Keimzahl der untersuchten Probe. Gleichzeitig wurden bei jeder Entnahme Röhrchen, die 10 ml Nährbouillon enthielten, mit je einem Tropfen der Testlösung beimpft.

Ergebnis: siehe Tabelle 2.

Da die Keimzählung von Bacillus subtilis nur ungenaue Ergebnisse brachte, wurde der Nachweis lebender Bakterien nur durch Überimpfung in Bouillonröhrchen gebracht. Noch nach 6 Wochen waren in sämtlichen Lösungen lebende Keime festzustellen.

Wie sich aus Tabelle 2 ergibt, bleiben die geprüften nicht Sporen bildenden Bakterien der untersuchten Augenlösungen nicht lange lebensfähig. Dagegen war Bacillus subtilis noch nach beträchtlicher Zeit nachweisbar. Ein Vergleich des Keimzahlverlaufs in den Augenlösungen und der Koch-

Tabelle 2

Verhalten der Keimzahlen in künstlich infizierten Augentropfen ohne Zusatz antimikrobieller Stoffe.

Keimzahlen in 1,0 ml

| Testkeim | Vers.-Beginn | 15h | 22h | 50h | 75h | 100h |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Eserin. salizylic. 0,25 % pH 6,35 | | |
| Ps. aer. I | 1800 | - | - | - | - | n. b. |
| Ps. aer. II | 1400 | - | - | - | - | n. b. |
| Ps. aer. III | 1500 | 210 | 85 | 5 | - | n. b. |
| Ps. aer. IV | 1950 | 90 | - | - | - | n. b. |
| E. coli | 1800 | 340 | 30 | 5 | - | n. b. |
| Staphyl. | 1000 | - | - | - | - | n. b. |
| | | | | Pilocarpin. hydrochloric. 2% pH 4,2 | | |
| Ps. aer. I | 1900 | 200 | 120 | 10 | - (+) | - |
| Ps. aer. II | 1400 | 640 | n. b. | 25 | 10 | - |
| Ps. aer. III | 700 | 330 | n. b. | 30 | 5 | - |
| Ps. aer. IV | 1400 | 510 | n. b. | 10 | - (+) | - |
| E. coli | 1800 | 300 | 50 | 15 | 5 | - |
| Staphyl. | 550 | 5 | - | - | - | - |
| | | | | Atropin. sulfuric. 0,5% pH 6,5 | | |
| Ps. aer. I | 1400 | - (+) | - | - | - | n. b. |
| Ps. aer. II | 1000 | - | - | - | - | n. b. |
| Ps. aer. III | 900 | - | - | - | - | n. b. |
| Ps. aer. IV | n. b. | n. b. | n. b. | n. b. | n. b. | n. b. |
| E. coli | 1000 | 70 | 30 | 5 | - | n. b. |
| Staphyl. | 700 | 10 | - | - | - | n. b. |
| | | | | NaCl 0,89 % pH 4,8 | | |
| Ps. aer. I | 2400 | 950 | 400 | 25 | - | n. b. |
| Ps. aer. II | 1350 | 40 | - | - | - | n. b. |
| Ps. aer. III | 1100 | 35 | - | - | - | n. b. |
| Ps. aer. IV | 1100 | 25 | - | - | - | n. b. |
| E. coli | 1300 | 650 | 250 | 20 | - | n. b. |
| Staphyl. | 800 | 65 | 20 | - | - | n. b. |

Zeichenerklärung:
- = kein Wachstum
-(+) = kein Wachstum auf Agar, aber Wachstum in Bouillon
n. b. = nicht bestimmt.

salzlösung zeigt, daß Keime nur in 2%iger Pilocarpinlösung trotz des sauren Milieus länger als in Kochsalzlösung überlebten. Eine Vermehrung der Bakterien war in keinem Falle nachweisbar.

Die Keimzahlen in der Atropinlösung lagen durchweg niedriger als in der NaCl-Lösung. Dieses Ergebnis könnte die von Dorello und D'Amelio (8) gemachte Beobachtung bestätigen, daß Atropinsulfat selbst eine leichte antibakterielle Wirkung besitzt. Richter (46) fand im Gegensatz dazu bei einer Infektionsdosis von ebenfalls etwa 2000 Keimen im ml der Testlösung Atropin. sulfuric. 1% noch nach acht Tagen lebende Pyozyaneusbakterien. Der Autor gibt allerdings nicht an, womit die Verdünnungen der Keimsuspension hergestellt wurden. Es wäre denkbar, daß dazu Nährbouillon verwandt und so bei der Infektion Nährstoffe in die Testlösung hineingebracht wurden. Eigene orientierende Versuche ergaben nämlich, daß die Überimpfung eines Tropfens Nährbouillon bei der Infektion in Eserin-, Pilocarpin- und Kochsalzlösung eine Vermehrung der Testbakterien erlaubt.

Dieser Befund erleichtert die Beantwortung der Frage, warum trotz der im Experiment recht kurzen Überlebenszeit in der Praxis so häufig Bakterien in Augenlösungen gefunden werden. Einmal wird zur Zubereitung der Tropfen immer noch häufig mit sehr vielen Keimen und damit auch organischem Material verunreinigtes destilliertes Wasser benutzt, zum anderen werden - zum Beispiel bei Berührungen des Tropfers - nicht nur Bakterien, sondern auch andere organische Stoffe in die Lösung gebracht, die den Mikroben als Nährstoffe dienen können. Darüberhinaus muß beachtet werden, daß sich natürlicherweise im Wasser lebende Bakterien auch unter sehr schlechten Nährstoffbedingungen vermehren können. Meist handelt es sich um gramnegative, bewegliche und biochemisch fast indifferente Stäbchen, die ebenfalls häufig in den großen Aqua-dest.-Flaschen der Apotheken gefunden werden. B. Schmidt (53) hat bei Untersuchungen über die Verwendbarkeit von Polystyrolerzeugnissen in Trinkwasserleitungen einfache Salzlösungen mit derartigen Keimen infiziert und durch Keimzählungen starke Vermehrung feststellen können. Mögli-

cherweise können diese apathogenen Bakterien auch durch besondere Stoffwechselleistungen anderen gefährlicheren Mikroben Nährstoffe bereitstellen. Kurzweil (29) hat solche Beziehungen zwischen hochthermoresistenten Sporenbildnern und Staphylokokken aufgezeigt, wobei erstere durch ihre Fähigkeit, elementaren Stickstoff zu verwerten, den Staphylokokken das Überleben und sogar die Vermehrung in weitgehend stickstofffreien Nährmedien erlaubten.

2. Untersuchungen über die bakteriostatische und bakterizide Aktivität einiger quartärer Ammoniumverbindungen und organischer Quecksilberpräparate in Augentropfen.

Als Methode zur Prüfung der Wirksamkeit antimikrobieller Zusätze in Augentropfen bietet sich der als Vorversuch bei der Prüfung chemischer Desinfektionsmittel (60) übliche Suspensionsversuch an, der in diesem Falle den Bedingungen der Praxis entspricht. Beim einfachen Offenstehenlassen von Flaschen, die Augentropfen enthalten, und der Prüfung des Inhalts in bestimmten Zeitabständen auf Sterilität wird der Inokulation von Bakterien durch infizierte Tropfer nicht Rechnung getragen.

Zur Ausschaltung der entwicklungshemmenden Nachwirkung in der Subkultur wurden verschiedene Verfahren angewandt:

a.) Membranfiltermethode unter Zusatz einer künstlichen Tränenflüssigkeit. Der Vorteil dieser Versuchsanordnung liegt darin, daß weitgehend die praktischen Bedingungen nachgeahmt werden.

b.) Zusatz von Substanzen zum Subkulturmedium, die eine spezifisch enthemmende Wirkung gegenüber den jeweiligen antimikrobiellen Stoffen besitzen. Hierbei fiel die Wahl bei den quartären Ammoniumverbindungen auf das bereits oben erwähnte Gemisch von 3 % Tween 80 und 0,3% Lecithin, wie es auch von Heicken und Bellinger (15) empfohlen worden ist. Die Enthemmung der organischen Quecksilberpräparate er-

folgte durch Zusatz von 0,5 g Cystein und 0,3 ml Thioglykolsäure zu 1 Liter Nährbouillon und Verdünnung auf 1:500. Dieses Verfahren hat sich nach Bonin und Mitarbeitern (2) als das wirksamste erwiesen.

Daneben wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

c.) Einige Versuche in vivo und

d.) Sterilitätskontrollen gebrauchter und mit antimikrobiellem Zusatz versehener Augentropfen.

zu a.) Membranfiltermethode unter Zusatz einer künstlichen Tränenflüssigkeit.

Versuchsanordnung:

10 ml verschiedener Augentropfen mit antimikrobiellem Zusatz wurden mit je 1 Tropfen (= 0,045 ml $\pm$ 0,005) 18-stündiger Bouillonkulturen der Teststämme und einer Sporensuspension von Bac. subtilis, die in Aqua dest. 1:10 verdünnt waren, beimpft und nach 2, 5, 10, 30 Minuten und bei Bedarf nach längeren Zeitabständen Entnahmen von 0,5 ml durchgeführt. Diese Proben wurden in Membranfiltergeräten, in die ein Coli-5-Filter eingelegt war, mit 20 ml einer künstlichen Tränenflüssigkeit versetzt. Das Gemisch wurde anschließend durch Sog filtriert und die Filterscheibe auf eine Agarschale bzw. eine Endoplatte bei E. coli und eine Blutplatte bei Staphylokokken als Testkeimen aufgelegt und eine Woche bei 37° C bebrütet.

Nach Hoppe-Seylers Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse (21) schwankt der Eiweißgehalt der Tränenflüssigkeit bei Gesunden zwischen 0,136 und 0,592 %. Bei Augenerkrankungen werden bis zu 0,98 % beobachtet. An Salzen enthält sie im wesentlichen Kochsalz. Der pH-Wert liegt durchschnittlich bei 7,5. Um eine ähnlich zusammengesetzte Flüssigkeit zu erhalten, wurde Ascites, der bis zu 6 g% Eiweiß enthält, mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt (1:5), durch Seitzfilter bakterienfrei filtriert und anschließend der pH-Wert auf 7,5 eingestellt.

Die Keimzahlen für die 18-stündigen Bouillonkulturen betrugen im Durchschnitt:

| | |
|---|---|
| Ps. aeruginosa | $4,7 \cdot 10^8$ Keime/ml |
| E. coli | $1,5 \cdot 10^8$ Keime/ml |
| Staphylococcus aureus | $4,6 \cdot 10^7$ Keime/ml |

Die Sporensuspension von Bacillus subtilis enthielt etwa $2,5 \cdot 10^8$ Keime. Die Infektionsdosis lag demnach bei der erwähnten Versuchsanordnung zwischen $2 \cdot 10^5$ und $2 \cdot 10^6$ Keimen auf 10,0 ml Testlösung. Diese Keimzahlen liegen etwa 100 x höher als bei einmaliger natürlicher Infektion zu erwarten ist (Richter 46).

zu b.) Versuchsanordnung mit spezifischer Enthemmung unter besonderer Berücksichtigung der verschiedenen Empfindlichkeit der Teststämme.

Da sich in der ersten Versuchsreihe der Laborstamm von Pseudomonas aeruginosa gegenüber den bakteriziden Substanzen als sehr empfindlich erwies, wurden 69 Stämme dieser Keimart auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Phenylquecksilberborat 1:100 000 und Benzalkoniumchlorid 1:50 000 geprüft und die resistentesten Stämme neben dem Laborstamm für die zweite Versuchsreihe ausgewählt.

Diesmal wurden verschiedene Präparate der beiden Stoffgruppen, aber nicht in Verbindung mit Augenarzneien, geprüft. Es wurden die Konzentration der Mittel und die Stärke der bakteriellen Infektion variiert.

Versuchsanordnung:
Die Durchführung des Suspensionsversuchs erfolgte wie beim vorigen Versuch. Enthielt die Lösung eine quartäre Ammoniumverbindung, so wurde bei jeder Abnahme 1 ml der Testlösung auf 9 ml einer Nährbouillon übertragen, der 3 % Tween 80 und 0,3% Lecithin zugesetzt waren; enthielt sie eine organische Quecksilberverbindung, so wurden jedesmal 4 Tropfen der Lösung in 100 ml Nährbouillon (Zusatz 0,5 g l-Cystein und 0,3 ml Thioglykolsäure pro Liter) überimpft, so daß ein Verdünnungseffekt von etwa 1 : 500 erreicht wurde. Die Tween-Lecithin-Bouillon wurde

Tabelle 3

Phenylmercuriborat 1 : 100 000

| Augenlösung | pH | Keim | Entnahme nach 2' | 5' | 10' | 30' | 60' | 120' | 180' | 300' | 24h |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Eserin. salizyl. 0,25% | 5,6 | Ps. aer. I | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | E. coli | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Staphyl. | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| | | Subtilis (Sporen) | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Pilocarpin. hydrochloric. 2 % | 4,3 | Ps. aer. I | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | E. coli | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| | | Staphyl. | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| | | Subtilis (Sporen) | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Mintacol solubile 1 % | 5,7 | Ps. aer. I | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | E. coli | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| | | Staphyl. | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| | | Subtilis (Sporen) | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Atropin. sulfuric. 0,5 % | 6,3 | Ps. aer. I | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | E. coli | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| | | Staphyl. | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| | | Subtilis (Sporen) | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Bestimmung der antibakteriellen Wirksamkeit von Phenylmercuriborat 1:100 000 in Augentropfen mit der Membranfiltermethode unter Zusatz einer künstlichen Tränenflüssigkeit ( Mittelwert aus 3 Versuchen ).

Zeichenerklärung:

+ = Wachstum auf den Coli-5-Filterscheiben nach Auflegen auf Agarplatten und Bebrüten für eine Woche

- = kein Wachstum auf den Membranfilterscheiben

Tabelle 4

Benzalkoniumchlorid - Winzer 1 : 20 000

| Augenlösung | pH | Keim | Entnahme nach 2' | 5' | 10' | 30' | 300' | 24h |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Eserin.sulfuric. 0,25 % | 6,1 | Ps.aer.I | - | - | - | - | - | - |
| | | E.coli | + | - | - | - | - | - |
| | | Staphyl. | - | - | - | - | - | - |
| | | Subtilis-(Sporen) | + | + | + | + | + | + |
| Eserin.salizylic. 0,25 % | 6,0 | Ps.aer.I | + | + | + | + | + | + |
| | | E.coli | + | + | + | + | + | + |
| | | Staphyl. | + | + | + | - | - | - |
| | | Subtilis-(Sporen) | + | + | + | + | + | + |
| Pilocarpin. hydrochloric. 2 % | 4,1 | Ps.aer.I | - | - | - | - | - | - |
| | | E.coli | - | - | - | - | - | - |
| | | Staphyl. | - | - | - | - | - | - |
| | | Subtilis-(Sporen) | + | + | + | + | + | + |
| Mintacol solubile 1 % | 4,2 | Ps.aer.I | + | + | - | - | - | - |
| | | E.coli | + | + | - | - | - | - |
| | | Staphyl. | - | - | - | - | - | - |
| | | Subtilis-(Sporen) | + | + | + | + | + | + |
| Atropin. sulfuric. 0,5 % | 6,0 | Ps.aer.I | - | - | - | - | - | - |
| | | E.coli | - | - | - | - | - | - |
| | | Staphyl. | - | - | - | - | - | - |
| | | Subtilis-(Sporen) | + | + | + | + | + | + |

Bestimmung der antibakteriellen Wirksamkeit von Benzalkoniumchlorid-Winzer 1 : 20 000 in Augentropfen mit der Membranfiltermethode unter Zusatz einer künstlichen Tränenflüssigkeit.

Zeichenerklärung:

+ = Wachstum auf den Coli-5-Filterscheiben nach Auflegen auf Agarplatten und Bebrüten für eine Woche

- = kein Wachstum auf den Membranfilterscheiben.

nach der Beimpfung maschinell 10 Minuten geschüttelt und anschließend wiederum 1 ml dieser Bouillon auf 100 ml normale Nährlösung übertragen. Sowohl das Tween-Bouillon-Röhrchen als auch das 100 ml-Bouillon-Kölbchen wurden 14 Tage bei 37° C inkubiert. In einigen Fällen war - vermutlich durch die weitere Verdünnung und Verringerung des Keimgehalts - nur in der ersten Kultur Wachstum zu beobachten, in der zweiten dagegen nicht. In der folgenden Tabelle wird daher nur das Ergebnis in der Tween-Lecithin-Bouillon aufgeführt.

zu c). Untersuchung der keimtötenden Wirkung von Benzalkoniumchlorid-Winzer durch Übertragung auf lebendes Gewebe

Versuchsanordnung: (modifiziert nach Riegelman und Mitarbeitern (49) )

10 ml einer Lösung von Benzalkoniumchlorid-Winzer 1:20 000 wurden mit zwei Tropfen einer 18-stündigen Bouillonkultur von Pseudomonas aeruginosa (Laborstamm I) infiziert. Nach einer Stunde wurden Proben von je 0,2 ml in die Allantoishöhle von sechs embryonierten Hühnereiern injiziert. Die Beimpfung erfolgte nach der Desinfektion der Impfstelle mit Jodtinktur etwa 0,5 cm unterhalb der Luftblasengrenze an einer gefäßfreien Stelle in eine Tiefe von ca. 0,3 cm. Zur Kontrolle wurden 4 weitere Eier auf dieselbe Weise mit infiziertem Aqua dest. (2 Tropfen Ps. aeruginosa-Bouillon auf 10,0 ml) beimpft. Alle Eier wurden 48 Stunden bei 37° C bebrütet, dann geerntet und die Allantoisflüssigkeit auf normale Bouillon und Agarplatten gebracht. Eine eingehende Darstellung der Technik der Eibeimpfung und Ernte von Eiflüssigkeiten findet sich bei Großgebauer (14).

Weitere Proben der künstlich infizierten Benzalkoniumchlorid-Lösung 1:20 000 wurden ebenfalls nach 60 min Einwirkungszeit im Tierversuch auf lebende Pyozyaneuskeime geprüft:

aa) auf der skarifizierten Kaninchencornea

bb) durch Infektion eines etwa 5x5 cm großen aufgerauhten Bezirks auf der Bauchhaut (Beide Male erfolgte die Infektion durch einen in der Lösung getränkten Tupfer)

cc) durch Injektion von 0,01 ml der Lösung in zwei Kaninchencorneae

Tabelle 5

| Präparat | Konzentr. | Keim | Entnahme nach 2' | 15' | 30' | 60' | 120' | 240' | 300' |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Phenyl-mercuri-borat | 1 : 10 000 | Ps I | + | - | - | - | - | - | - |
| | | Ps 27 | + | - | - | - | - | - | - |
| | | Ps 59 | + | - | - | - | - | - | - |
| | 1 : 50 000 | Ps I | + | - | - | - | - | - | - |
| | | Ps 27 | + | + | + | + | + | - | - |
| | | Ps 59 | + | + | + | - | - | - | - |
| | 1 : 100 000 | PS I | + | + | - | - | - | - | - |
| | | Ps 27 | + | + | + | + | + | + | - |
| | | Ps 59 | + | + | + | + | + | + | - |
| Phenyl-mercuri-nitrat | 1 : 10 000 | Ps I | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Ps 27 | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Ps 59 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 1 : 50 000 | PS I | + | - | - | - | - | - | - |
| | | Ps 27 | + | + | + | + | + | - | - |
| | | Ps 59 | + | + | + | - | - | - | - |
| | 1 : 100 000 | Ps I | + | - | - | - | - | - | - |
| | | Ps 27 | + | + | + | + | + | - | - |
| | | Ps 59 | + | + | + | + | + | - | - |

Bestimmung der bakteriziden Wirksamkeit verschiedener organischer Quecksilberpräparate gegen Pseudomonas-aeruginosa-Stämme unterschiedlicher Resistenz.

Der pH-Wert der Lösungen lag zwischen 4,4 und 5,2, da als Lösungsmittel stark saures Aqua tridest. verwandt wurde (pH = 4,6).

Zeichenerklärung:

Ps = Pseudomonas aeruginosa
\+ = Wachstum in der Subkultur
\- = kein Wachstum

Tabelle 6

| Präparat | Konzentr. | Keim | Entnahme nach 2' | 15' | 30' |
|---|---|---|---|---|---|
| Benzalkonium-chlorid-Winzer | 1 : 20 000 | Ps I | - | - | - |
| | | Ps 35 | + | - | - |
| | | Ps 41 | - | - | - |
| | 1 : 50 000 | Ps I | - | - | - |
| | | Ps 35 | + | - | - |
| | | Ps 41 | + | - | - |
| Benzalkonium-chlorid USP | 1 : 20 000 | Ps I | - | - | - |
| | | Ps 35 | - | - | - |
| | | Ps 41 | - | - | - |
| | 1 : 50 000 | Ps I | + | - | - |
| | | Ps 35 | + | + | - |
| | | Ps 41 | - | - | - |
| Centrimide | 1 : 20 000 | Ps I | - | - | - |
| | | Ps 35 | - | - | - |
| | | Ps 41 | - | - | - |
| | 1 : 50 000 | Ps I | - | - | - |
| | | Ps 35 | - | - | - |
| | | Ps 41 | - | - | - |

Bestimmung der bakteriziden Wirksamkeit verschiedener quartärer Ammoniumverbindungen gegen Pseudomonas-aeruginosa-Stämme unterschiedlicher Resistenz.

Der pH-Wert der Lösungen betrug zwischen 4,3 und 4,8.

Zeichenerklärung:
Ps = Pseudomonas aeruginosa
\+ = Wachstum in der Subkultur
\- = kein Wachstum

Tabelle 7

| Infektionsdosis | Testkeim | Präparat | Konz. X $10^{-4}$ | Entnahme nach 1h | 2h | 5h | 20h | 50h | 7 Tagen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0,1 ml einer unverdünnten 18-stündigen Bouillonkultur auf 10,0 ml Lösung | Ps 35 | BW | 2 | - | - | - | - | - | - |
| | | BW | 5 | - | - | - | - | - | - |
| | | BU | 2 | + | - | - | - | - | - |
| | | BU | 5 | + | + | - | - | - | - |
| | | C | 2 | - | - | - | - | - | - |
| | | C | 5 | + | + | - | - | - | - |
| | PS 41 | BW | 2 | - | - | - | - | - | - |
| | | BW | 5 | - | - | - | - | - | - |
| | | BU | 2 | - | - | - | - | - | - |
| | | BU | 5 | + | + | - | - | - | - |
| | | C | 2 | - | - | - | - | - | - |
| | | C | 5 | - | - | - | - | - | - |
| 1,0 ml einer unverdünnten 18-stündigen Bouillonkultur auf 10,0 ml Lösung | Ps 35 | BW | 2 | + | - | - | - | - | - |
| | | BW | 5 | + | + | + | + | + | + |
| | | BU | 2 | + | + | + | - | - | - |
| | | BU | 5 | + | + | + | + | + | + |
| | | C | 2 | - | - | - | - | - | - |
| | | C | 5 | - | - | - | - | - | - |
| | Ps 41 | BW | 2 | + | + | + | - | - | - |
| | | BW | 5 | + | + | + | + | + | + |
| | | BU | 2 | + | + | + | - | - | - |
| | | BU | 5 | + | + | + | - | - | - |
| | | C | 2 | - | - | - | - | - | - |
| | | C | 5 | + | + | + | + | + | + |

Bestimmung der bakteriziden Wirksamkeit einiger quartärer Ammoniumverbindungen gegen die Pseudomonas aeruginosa-Stämme 35 und 41 bei erhöhter Infektionsdosis im Suspensionsversuch ( Zusatz von 3 % Tween 80 und 0,3 % Lecithin zur Subkultur ).

Zeichenerklärung:

Ps = Pseudomonas aeruginosa
BW = Benzalkoniumchlorid-Winzer ( Tetraseptan WZ )
BU = Benzalkoniumchlorid USP
C = Centrimide
\+ = Wachstum in der Subkultur
\- = kein Wachstum

Ergebnis:

Nachdem sich die Testlösung auf künstlichen Nährböden als keimfrei erwiesen hatte, konnten auch nach diesen Methoden in keinem Fall lebende Pyozyaneusbakterien nachgewiesen werden. Die Abstriche waren durchweg negativ, während die Kontrollen auf bebrüteten Hühnereiern sämtlich stark bewachsen waren.

Riegelman und Mitarbeiter (49) fanden bei ihren ähnlichen Versuchen mit Benzalkoniumchlorid USP 1 : 5000 und stärkster Infektion ( 1 ml einer 24-stündigen Bouillonkultur von Ps. aeruginosa = etwa $10^9$ Keime auf 9 ml Lösung) Überlebenszeiten von 3 Tagen.

zu d). Sterilitätsprüfungen von z. T. mit antimikrobiellem Zusatz versehenen Augentropfen aus im Gebrauch befindlichen Flaschen

Um den Effekt des Zusatzes von antimikrobiellen Stoffen in der Praxis zu prüfen, wurden die in Gebrauch befindlichen Augentropfen einer großen klinischen Augenambulanz auf ihren Keimgehalt untersucht. +) Die Lösungen befanden sich in Pipettenflaschen mit eingeschliffenem Stöpsel. Die Entnahmen wurden an vier verschiedenen Tagen ( 1. - 4. Entnahme ) im Anschluß an die Ambulanzstunden durchgeführt. Es wurden jeweils 2 ml der Lösung in sterile Reagenzgläser übertragen und von dort nach 15 Minuten, 2 und 20 Stunden Sterilitätsprüfungen durchgeführt. Da sich innerhalb der Prüfungszeiten keine Differenzen der Befunde ergaben, wird in der folgenden Tabelle 8 nur das Gesamtergebnis aufgeführt.

---

+) Dem Chefarzt der Augenabteilung des Städtischen Rudolf-Virchow-Krankenhauses Berlin, Herrn Professor Dr. med. K. Vogelsang, möchte ich für sein Interesse und seine freundliche Unterstützung herzlich danken.

Tabelle 8

Ergebnisse der Sterilitätsprüfungen gebrauchter Augentropfen

| Augenlösung | antimikrobieller Zusatz | 1. und 2. Entnahme | 3. und 4. Entnahme |
|---|---|---|---|
| Atropin. sulfur. 1 % | BW | gramneg. Stäbchen | - |
| Homatropin. hydrobr. 0,5 % | BW | gramneg. Stäbchen | - |
| Scopolamin. hydrobr. 0,3 % | BW | gramneg. Stäbchen | - |
| Pilocarpin. hydrochl. 2 % | BW | gramneg. Stäbchen | - |
| Fluorescein-Natrium 10 % | ø | gramneg. Stäbchen | gramneg. Stäbchen |
| Eserin. salizyl. 0,5 % | Nip-Nip | - | - |
| Mintacol solubile 1 % | ø | gramneg. Stäbchen | - |
| NaCl-Lösung 0,89 % | ø | gramneg. Stäbchen | gramneg. Stäbchen |
| Targesin 5 % | ø | grampos. Kokken | n.b. |
| Colargol 5 % | ø | - | - |
| Hydrarg. oxycyanat. 0,1 % | ø | - | - |
| Argent. nitric. 1 % | ø | - | - |
| Veritol (Knoll) | ? | - | - |
| Mydrial (Winzer) | BW | - | - |
| Mydraticum (Roche) | PMN | - | - |
| Nebacetin (Byk) | ? | - | - |
| Aristamid (Nordmark) | ? | - | - |

Zeichenerklärungen:

BW = Benzalkoniumchlorid-Winzer 1 : 20 000
PMN = Phenylmercurinitrat 0,001 %
Nip-Nip = Nipaestergemisch 0,1 %
ø = ohne Zusatz
n.b. = nicht bestimmt, da das Mittel nicht mehr angewandt wurde
? = fraglich
- = kein Bakteriennachweis

Die in der physiologischen Kochsalzlösung gefundenen gramnegativen Stäbchen waren aerob und beweglich. Sie bildeten gelbgrünen Farbstoff, der in Chloroform nicht ausschüttelbar war. Sie wuchsen bei 22° C und 37° C, aber nicht bei 42° C. Die Eigelb-Reaktion (Klinge 27) war stark positiv. Es handelt sich hier wahrscheinlich um Pseudomonas fluorescens.

Bei den übrigen gramnegativen Stäbchen war der Versuch einer Differenzierung recht schwierig. Sie waren beweglich, wuchsen überwiegend streng aerob und bildeten kein Pigment. Das Wachstum erfolgte bei 22°C, aber nicht bei 37° C. Glukose, Laktose, Saccharose, Mannit, Sorbit, Rhamnose, Maltose und Inosit wurden nicht angegriffen, Gelatine von der Mehrzahl der Stämme verflüssigt, Nitrat fast stets reduziert, Lackmusmilch gesäuert. Ammoncitrat und Harnstoff waren meist positiv. Die Eigelb-Reaktion zeigte ein schwach positives Ergebnis (Trübung des Eigelb-Mediums unter dem Impfstrich). Diese Befunde legen eine Einordnung dieser Bakterien in die Familie der Achromobakteriazeen nahe.

Die grampositiven Kokken, die in der Targesinlösung gefunden wurden, waren kettenförmig gelagert. Nach biochemischer Prüfung wurden sie als vergrünende Streptokokken der Gruppe D (vermutlich Enterokokken) angesehen. Positiv waren Optochin, Aesculin, Arabinose, Maltose, Saccharose, Laktose, Trehalose und Salicin, während Raffinose, Mannit und Sorbit nicht angegriffen wurden. Gelatine wurde nicht verflüssigt. In Lackmusmilch traten Säurebildung und Gerinnung auf.

Da die 14 Tage später durchgeführte zweite Entnahme die gleiche Verunreinigung der Augenlösungen zeigte, obwohl die Tropfen einen Tag vorher erneuert und die Tropfgläser sterilisiert worden waren, wurde eine Infektionsquelle in der Apotheke vermutet. Tatsächlich war die zur Herstellung der Augentropfen benutzte Benzalkoniumchlorid-Winzer-Lösung 1:20 000, von der sich mehrere Liter in einer Vorratsflasche befanden, erheblich mit gramnegativen Stäbchen verunreinigt (640 000 Keime/ml). In einer Probe dieser Lösung, die bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurde, konnten drei Wochen später 100 000 Keime/ml und sechs Wochen später immer noch 90 000/ml gezählt werden. Wurden aber 10 ml derselben Lösung nach Sterilisation mit einem Tropfen einer 18-stündigen Kultur von Ps. aeruginosa I beimpft, so kam es wie gewöhnlich schon bei der ersten Überimpfung nach zwei Minuten und Bebrütung bei 37° C zu keinem Wachstum. Die Benzalkonium-Winzer-Lösung war also gegenüber Pseudomonas

aeruginosa voll wirksam, nicht aber gegenüber den gefundenen gramnegativen Stäbchen aus der Familie der Achromobakteriazeen.

Die 1 %ige Stammlösung von Benzalkonium-Winzer wurde einige Male auf ihren Keimgehalt untersucht und stets keimfrei gefunden. Dagegen waren im Aqua dest. der Apotheke, mit dem die Stammlösung verdünnt worden war, große Mengen gramnegativer Stäbchen nachweisbar, deren mikroskopisches Bild und biochemisches Verhalten den in der Benzalkonium-Winzer-Lösung 1:20 000 der Apotheke und in verschiedenen Augentropfen gefundenen Keimen entsprachen.

Bei der Prüfung der Virulenz des in der Benzalkonium-Winzer-Lösung gefundenen Keims ergab sich ein negatives Ergebnis. Eine 1:100 verdünnte Bouillonkultur ( 48 Stunden bei 22° C) wurde mit einem Tupfer in zwei scarifizierte Kaninchencorneae eingerieben und - wie von McCulloch (37) angegeben - die Augen durch Leukoplaststreifen verschlossen. Nach 24, 48 und etwa 100 Stunden wurden Abstriche angefertigt, die in keinem Falle mehr Wachstum der eingeimpften Bakterien ergaben. Auch klinische Erscheinungen konnten nicht beobachtet werden.

Nach diesen Ergebnissen wurden die Augentropfen von der Apotheke mit sterilisiertem Aqua bidestillata zubereitet. Das Antiseptikum wurde der fertigen Lösung zugesetzt. Bei den folgenden Prüfungen erwiesen sich die mit Benzalkoniumchlorid-Winzer 1 : 20 000 konservierten Augenlösungen als keimfrei, sofern sie in sterilisierte Gefäße abgefüllt worden waren. Daraus läßt sich folgern, daß dieser Zusatz die meisten bakteriellen Verunreinigungen beim Gebrauch entfernen kann, wenn bei der Herstellung aseptische Bedingungen eingehalten werden.

### 3. Untersuchungen über die Stabilität antimikrobieller Zusätze bei der Herstellung von Augentropfen

Es wurde die antibakterielle Wirksamkeit von Benzalkoniumchlorid-Winzer ( 1:20 000 ) und Phenylmercuriborat ( 1:100 000 ) nach Filtration, Erhit-

zen auf 100° C für 30 Minuten und Sterilisieren im Autoklaven geprüft. Dies sind neben der aseptischen Zubereitung übliche Verfahren, sterile bzw. keimarme Augenlösungen herzustellen.

Filtriert wurde durch Seitzfilter, Ganzglasbakterienfilter, Berkefeldfilterkerze und Coli-5-Membranfilter. Außerdem wurden Papierfilter (Macherey, Nagel & Co., Düren, Nr. 615) in die Untersuchung mit einbezogen, die regelmäßig in der Apotheke zur Entfernung von Schwebestoffen verwandt werden. Besonders bei den quartären Ammoniumverbindungen besteht die Gefahr der Inaktivierung durch im Filter zurückgebliebene Waschmittelreste. Aus diesem Grunde wurden die Filtergeräte vor Versuchsbeginn gründlich mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend erfolgte die Sterilisation im Autoklaven.

Um den Effekt der Waschung zu kontrollieren, wurden zuerst etwa 50 ml destilliertes Wasser filtriert, unter aseptischen Bedingungen der Saugflasche entnommen und anschließend die Filtration von 50 ml der jeweiligen antimikrobiellen Lösung durchgeführt. Das destillierte Wasser der Vorfiltration wurde durch tropfenweises Zugeben der betreffenden Stammlösungen ebenfalls mit Benzalkoniumchlorid-Winzer bis zu einer Konzentration von 1 : 20 000 bzw. Phenylmercuriborat bis 1 : 100 000 versetzt.

Die Prüfung der antibakteriellen Wirksamkeit erfolgte durch Beimpfen von 10 ml Testlösung mit einem Tropfen einer 18-stündigen Bouillonkultur von Pseudomonas aeruginosa I. Nach 2, 15, 30, 60, 120, 300 Minuten und 24 Stunden wurde mit einer 1,0 ml-Pipette jeweils ein Tropfen der Lösung auf 10 ml normale Nährbouillon übertragen und bei 37° C für eine Woche inkubiert.

Ergebnisse siehe Tabelle 9.

Die Prüfung der Wirksamkeit der Lösungen aus der Kontrollreihe (tropfenweises Zugeben der Stammlösung zum vorher filtrierten Aqua destillata) ergab in allen Fällen das gleiche Ergebnis wie die Kontrollen des

Tabelle 9

Ergebnisse der Prüfung verschiedener Antiseptika auf ihre bakteriostatische Wirksamkeit gegen Pseudomonas aeruginosa I nach Filtration, Kochen und Autoklavieren

| Präparat | Behandlung | Entnahme nach 2' | 15' | 30' | 60' | 120' | 300' | 24h |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Benzalkonium-chlorid-Winzer 1 : 20 000 | 1. Filtration | | | | | | | |
| | a) Papier | - | - | - | - | - | - | - |
| | b) Seitz | + | + | + | + | + | + | + |
| | c) Membran | + | + | + | + | + | + | + |
| | d) Glasfritte | + | + | + | - | - | - | - |
| | e) Berkefeld | + | + | + | + | + | + | + |
| | 2. Kochen | - | - | - | - | - | - | - |
| | 3. Autoklavieren | - | - | - | - | - | - | - |
| | 4. unbehandelt (Kontrolle) | - | - | - | - | - | - | - |
| Phenyl-mercuriborat 1 : 100 000 | 1. Filtration | | | | | | | |
| | a) Papier | + | - | - | - | - | - | - |
| | b) Seitz | + | + | + | + | - | - | - |
| | c) Membran | + | + | + | + | - | - | - |
| | d) Glasfritte | + | + | - | - | - | - | - |
| | e) Berkefeld | + | + | + | + | + | - | - |
| | 2. Kochen | + | - | - | - | - | - | - |
| | 3. Autoklavieren | + | - | - | - | - | - | - |
| | 4. unbehandelt (Kontrolle) | + | - | - | - | - | - | - |

Zeichenerklärung: + = Wachstum
- = kein Wachstum

Hauptversuchs, nämlich, daß bei Verwendung von Benzalkoniumchlorid-Winzer bereits nach zwei Minuten, bei Verwendung von Phenylmercuriborat nach 15 Minuten kein Bakterienwachstum beobachtet werden konnte. Der beobachtete Wirkungsverlust muß also an den Filtrationsvorgang selbst gebunden sein. Im Filtergerät zurückgebliebene lösliche Stoffe, denen die Fähigkeit der Inaktivierung zugekommen wäre, hätten auch im Filtrat einen Wirkungsverlust des Antiseptikums verursachen müssen.

## III. Diskussion

Die unterschiedlichen Ergebnisse bei der Wirksamkeitsprüfung antimikrobieller Stoffe in Augentropfen scheinen nach den Ergebnissen der Versuche II, 2b und c weniger durch die Methodik als durch die Stärke der Infektion sowie vor allem die unterschiedliche Resistenz der Bakterienstämme bedingt zu sein. Diese Feststellung unterstreicht auch die Tatsache, daß eine genaue Wiederholung der Versuche von Anderson und Stock (1) mit den eigenen resistentesten Pyozyaneusstämmen für Benzalkoniumchlorid-Winzer 1 : 20 000 und Phenylmercurinitrat 1 : 10 000 in keinem Falle Überlebenszeiten von 15 Minuten ergab, während die Stämme der genannten Autoren nach ihren Berichten von Benzalkoniumchlorid-USP und Phenylmercurinitrat in gleicher Konzentration innerhalb einer Stunde nicht abgetötet worden waren.

Die verschiedenen Präparate beider Stoffgruppen, die einer vergleichenden Prüfung unterzogen wurden, erwiesen sich als ungefähr gleichwertig (II, 2b).

Um als antimikrobieller Zusatz in Augentropfen geeignet zu sein, müssen folgende speziellen Eigenschaften von dem jeweiligen Antiseptikum gefordert werden:

1. Wirksamkeit der am Auge verträglichen Desinfektionsmittelkonzentration in möglichst kurzer Zeit (Heß (17)) fordert eine Abtötung aller Mikroben innerhalb 30 Minuten bis höchstens 2 Stunden).
2. Keine Beeinflussung des Mittels durch die Tränenflüssigkeit.
3. Chemische Verträglichkeit mit den jeweiligen Arzneistoffen; die Wirkungsabhängigkeit vom Säuregrad der Augenlösung muß bekannt sein.
4. Gewährleistung der Stabilität der antimikrobiellen Wirksamkeit bei der Herstellung von Augentropfen.

zu 1.

Soehring und Mitarbeiter (56) erprobten die Reizwirkung der einzelnen Zusätze mit einer sehr empfindlichen Methodik. Sie empfahlen als geeignete unschädliche Zusätze quartäre Ammoniumverbindungen in einer Konzentration von 1 : 50 000 und organische Quecksilberpräparate in einer solchen von 1 : 100 000. Die Wirksamkeit dieser Lösungen reicht nach den vorliegenden Ergebnissen aus, um ein Bakterienwachstum in Augenlösungen zu verhindern und viele verunreinigende Bakterien abzutöten. Nach Untersuchungen von Richter (46) können durch einmaliges Berühren des nicht entzündeten Bindehautsacks bis zu 35 Keime, bei bestehender Konjunktivitis bis zu 800 Keime durch die Pipette in die Augentropfen gelangen. Diese Werte liegen erheblich unter der meist benutzten experimentellen Infektionsdosis (etwa $10^5$ Keime auf 10 ml). Bei der starken Abhängigkeit der Versuchsergebnisse von der Infektionsstärke können die experimentell erhaltenen Abtötungszeiten nicht ohne weiteres auf die Praxis übertragen werden, sondern es ist mit einer rascheren Abtötung zu rechnen.

Die Abtötungszeit ist bei den quartären Ammoniumverbindungen bedeutend kürzer als bei den organischen Hg-Präparaten, wenn die von Soehring und Mitarbeitern empfohlenen Konzentrationen verglichen werden. Sie liegt für Benzalkoniumchlorid-Winzer nach Ergebnissen mit eigenen hochresistenten Pyozyaneusstämmen unter Verwendung einer Infektionsdosis von etwa $10^5$ Keimen auf 10 ml Lösung bei 30 Minuten, während Phenylmercuriborat erst nach fünf Stunden bakterizid wirkte.

Sowohl Benzalkoniumchlorid als auch Phenylmercuriborat besitzen in den angegebenen Konzentrationen keine keimtötende Wirkung gegen Sporen von Bacillus subtilis. Häufig waren jedoch schwere Augeninfektionen auf Sporenbildner wie den Heubazillus zurückzuführen (Butler (3), Lutz (35), Oesterle (42) und Silberschmidt (55) ). Ebenso ist ihre Wirkung gegenüber den Virusarten sehr fraglich (Damm 4), so daß es sich bei der Behandlung von Keratokonjunktivitis-Kranken empfiehlt, nur Einzeldosenbehälter zu verwenden.

Es muß weiter auf die fehlende Wirksamkeit der quartären Ammoniumverbindungen gegen manche Keime aus der Gruppe der beweglichen, gramnegativen Stäbchen hingewiesen werden. Auch bei den vorliegenden Untersuchungen wurde ein derartiger Stamm gefunden (II, 2d). Ein solcher Befund ist in den letzten Jahren häufiger erhoben worden. Lowbury (34), Dold und Gust (6), Lee und Mitarbeiter (32) sowie Malizia und Mitarbeiter (36) haben in Desinfektionslösungen, die weit höhere Konzentrationen quartärer Ammoniumsalze enthielten, als es in Augentropfen möglich ist, ebenfalls gramnegative Stäbchen und sogar Pseudomonas aeruginosa gefunden. In einigen Fällen haben diese infizierten Lösungen zu schweren Hospitalinfektionen geführt (32, 36). Der Grund für diese Befunde ist vermutlich außerdem in der Zubereitung der Lösungen mit bakteriell verunreinigtem Wasser sowie in unsachgemäßer Anwendung und einem damit verbundenen Verlust an quartärer Ammoniumbase (z. B. Aufbewahren von Tupfern in der Desinfektionslösung) zu suchen.

Verursachen manche dieser Keime - wie z. B. im vorliegenden Falle - keine direkten Schäden am Auge des Patienten, so muß trotzdem der Bakterienbefall einer Arzneimittellösung gefürchtet und verhindert werden. Häufig können gerade die gramnegativen Stäbchen die Haltbarkeit von Augentropfen stark herabsetzen. Kedzia und Mitarbeiter (23) stellten eine fast vollständige Spaltung einer 1 %igen Atropinlösung durch 38 von 41 geprüften Pseudomonasstämmen innerhalb von 36 bis 48 Stunden fest.

zu 2.

Die zu den Versuchen verwendete Tränenflüssigkeit ist in der Lage, bei Zusatz zur Subkultur die entwicklungshemmende Wirkung von Phenylmercuriborat 1 : 100 000 besonders gegen Staphylokokken herabzusetzen (II, 2a). Die Wirkung von Benzalkoniumchlorid-Winzer konnte nicht beeinflußt werden.

Whitehill (59) hat die Wirkung von Desinfektionsmitteln auf Staphylokokken in einer ähnlich zusammengesetzten künstlichen Tränenflüssigkeit ge-

prüft und ist zum gleichen Ergebnis gekommen. Gottsacker (13) konnte in Gegenwart von Eiweiß eine gute Wirksamkeit von Zephirol nachweisen.

zu 3.

Unverträglichkeiten mit Arzneistoffen sind für beide hier bearbeiteten antimikrobiellen Zusätze bekannt. Bei den quartären Ammoniumverbindungen handelt es sich um Reaktionen mit Salizylaten und Nitraten, bei den organischen Quecksilberpräparaten mit Halogenen. Genaue Zusammenstellungen finden sich für Benzalkoniumchlorid USP bei Lawrence (31), für Phenylmercuriborat bei Mirimanoff und Cuttat (39).

Die antibakterielle Wirkung von Benzalkoniumchlorid wird durch diese Reaktionen praktisch aufgehoben, wie die Prüfung einer Lösung von Eserin. salizylic. bei Zusatz dieses Mittels ergab (II, 2a). Dagegen erfährt nach Mirimanoff und Cuttat (39) eine Phenylmercuriboratlösung 1:100 000 bei der großen Verdünnung in Verbindung mit halogenhaltigen Augenarzneien keinen Wirkungsverlust. Ebenso ist keine Ausfällung mehr zu beobachten. Diese Ergebnisse konnten durch eigene Untersuchungen mit Mintacol solubile (Bayer) bestätigt werden. Inwieweit allerdings die Wirksamkeit der Augenarznei durch Unverträglichkeitsreaktionen beeinflußt wird, ist fraglich.

Nach Untersuchungen von Heß und Speiser (18), die die pH-Abhängigkeit bakterizider Stoffe geprüft haben, läßt die Wirksamkeit von Phenylmercuriborat (einer kationisch wirksamen Quecksilberverbindung), von Cetylpyridiniumchlorid und anderen quartären Ammoniumsalzen in saurer Lösung nach.

In eigenen Untersuchungen konnte dieser Effekt, z. B. bei der recht sauren Pilocarpinlösung, nicht festgestellt werden (II, 2a). Er läßt sich, da er bei manchen Präparaten nicht sehr ausgeprägt ist, wohl auch nur mit einer empfindlicheren Methodik darstellen. Auf jeden Fall wird aber die angestrebte Isotonie nicht nur die Reizwirkung der Augentropfen herabsetzen, sondern auch ein günstigeres Milieu für die Wirksamkeit antimikrobieller Zusätze schaffen.

zu 4.

Die leichte Absorbierbarkeit der oberflächenaktiven Substanzen und Schwermetallionen ist bekannt. Eine auf diesem Wege mögliche Inaktivierung antibakterieller Stoffe bei der Herstellung von Augentropfen ist jedoch nicht genügend herausgestellt worden. In Apotheken ist es vielfach üblich, mehrere Liter der antibakteriellen Lösungen aufzubewahren und als Lösungsmittel zur Herstellung von Augentropfen zu verwenden. Diese Methode ist sicher genauer als das tropfenweise Zusetzen einer antibakteriellen Stammlösung zu den fertigen Collyrien ( Mirimanoff und Cuttat (39) ). Sie verbietet sich jedoch, da Filtrationen zumindest einen Teil des antibakteriellen Zusatzes inaktivieren. Filtration der Augentropfen ist meist notwendig, um Schwebestoffe zu entfernen oder sichere Bakterienfreiheit zu erzielen.

Während Phenylmercuriborat durch die Filtrationsprozesse nur einen geringen Wirkungsverlust erfährt, wird Benzalkoniumchlorid-Winzer sehr leicht inaktiviert ( II, 3). Am deutlichsten ist dieser Effekt nach Filtration durch Berkefeldfilterkerzen, durch Seitz- und Membranfilter, während er bei Ganzglasbakterienfiltern geringer und bei Papierfiltern mit der durchgeführten Methodik überhaupt nicht mehr nachweisbar ist. Allerdings beobachteten Rahn und van Eseltine (45) auch eine beträchtliche Absorption von quartären Ammoniumbasen an Filterpapier.

Titrimetrisch bestimmt wurde der Verlust an quartären Ammoniumsalzen von Kundsin und Walter (28). Sie stellten fest, daß schon das Umschütteln in zerkratzten Glasröhrchen den Gehalt einer Lösung an Cetylpyridiniumchlorid um 27 % herabsetzen kann.

Es ist daher zu fordern, daß auf jeden Fall erst den fertigen Augenlösungen antimikrobielle Stoffe zugesetzt werden, wie es von Neuwald, Soehring und Klingmüller (40) in ihrem Vorschlag für das Deutsche Arzneibuch 7. Ausgabe auch gefordert wird. Die Stammlösungen können ohne Wirkungsverlust durch Autoklavieren keimfrei gemacht werden.

Es kann abschließend also folgendes festgestellt werden: Benzalkoniumchlorid-Winzer und andere quartäre Ammoniumverbindungen, wie Benzalkoniumchlorid USP und Centrimide, besitzen eine gute antimikrobielle Wirksamkeit, wenn sie Augentropfen in einer Verdünnung von 1 : 20 000 bis 1 : 50 000 zugesetzt werden. Dies zeigen vor allem die Ergebnisse von Sterilitätsprüfungen an gebrauchten und mit quartären Ammoniumverbindungen versetzten Augentropfen. Nach Untersuchungen von Richter (46), Friesen (10) und Goettsch (12) waren die Lösungen stets keimfrei. Eigene Untersuchungen konnten diese Befunde bestätigen, nachdem stärkere bakterielle Verunreinigungen bei der Herstellung der Augentropfen unmöglich gemacht worden waren.

Als antibakterieller Zusatz kann auch Phenylmercuriborat oder -nitrat in einer Verdünnung von 1 : 100 000 verwandt werden. Die Wirksamkeit der organischen Quecksilberpräparate ist jedoch geringer und ihre Verträglichkeit weniger gut. Kleberger (24) beobachtete bei der Konservierung von Augentropfen mit Phenylmercuriborat mehrmals heftige Reizerscheinungen an den Augen der behandelten Patienten, die vermutlich auf den antimikrobiellen Zusatz zurückzuführen waren.

Der Apotheker hat auf chemische Verträglichkeit der antimikrobiellen Zusätze mit den Arzneistoffen zu achten. Auf dem Etikett ist der Zusatz anzugeben. Für die üblichen Augentropfen ist eine gewissenhafte aseptische Herstellung ausreichend (I, 5), aber in jedem Falle notwendig, da Verunreinigungen die Lebensfähigkeit von Bakterien in Augentropfen verbessern (II, 1).

Wie Untersuchungen von Odebrecht und Richter (41) zeigen, sind auch neue Arzneiflaschen teilweise recht stark bakteriell verunreinigt. Die Flaschen müssen also in jedem Falle sterilisiert werden. Beim Auswaschen der Gefäße müssen alle Waschmittelreste gründlichst entfernt werden, um eine Inaktivierung der zugesetzten quartären Ammoniumverbindung zu verhindern. Zur Herstellung der Augenlösungen muß - wie schon oft gefordert - frisch destilliertes und unmittelbar anschließend sterilisiertes Wasser verwandt werden.

Manche antimikrobiellen Stoffe überstehen eine Filtration nicht ohne Wirkungsverlust, sie müssen daher der fertigen Lösung tropfenweise zugesetzt werden.

Der Ophthalmologe muß wissen, daß Bakterien, die aus der Luft oder über den Tropfer in seine Augenlösungen gelangen, von den zugesetzten quartären Ammoniumverbindungen in sehr kurzer Zeit abgetötet werden. Eine Zeit, in der mit Sicherheit sämtliche Bakterien abgetötet sind, kann allerdings nicht angegeben werden, da es offenbar gegen quartäre Ammoniumverbindungen völlig unempfindliche Keime gibt. Ebenfalls werden Sporen und vermutlich auch Viren nicht abgetötet.

Größte Sicherheit ist in der Praxis nur so zu erreichen, daß das Pflegepersonal und auch der Patient angewiesen werden, sehr sorgfältig jede Infektion der Tropfen zu vermeiden und bei schwerer Infektion des Tropfers diesen oder die gesamte Lösung auszuwechseln. Es sollten nur solche Tropfflaschen benutzt werden, die weniger leicht als die üblichen eine bakterielle Verunreinigung zulassen. Von Schmid (51) sind z. B. Flaschen mit eingearbeitetem Tropfer empfohlen worden (Augentropfgläser EMKA der Firma Müller und Krempel, Zürich; Zentrop-Augentropfgläser der Firma J. W. Remy, Höhr-Grenzhausen). Häufigere Sterilitätskontrollen sollten durchgeführt werden, um die Wirksamkeit der getroffenen Maßnahmen zu kontrollieren.

Eine Bemerkung soll noch über den Gebrauch von Targesin in der Augenheilkunde gemacht werden. Bei den Sterilitätskontrollen der in der Klinik gebrauchten Augentropfen wurden in Targesin zweimal vergrünende Streptokokken gefunden. Im Zusammenhang mit den Untersuchungen von Rintelen (50), der in Argentum-tannicum-albuminat ebenfalls vergrünende Streptokokken und Colibakterien nachweisen konnte, und Klein (25), der Pseudomonas aeruginosa fand, sollte dieser Befund zeigen, daß dieses Medikament keine antibakterielle Wirksamkeit gegen diese Keime besitzt.

## C. ZUSAMMENFASSUNG

Im Zusammenhang mit Untersuchungen über die bakterielle Verunreinigung von Augentropfen wurden die Lebensfähigkeit von Bakterien in nicht konservierten Augenlösungen untersucht und die Wirksamkeit einiger antimikrobieller Zusätze geprüft. Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Lebende Pseudomonas aeruginosa-, Escherichia coli- und Staphylococcus aureus-Keime konnten höchstens 75 Stunden in den nicht konservierten Augenlösungen nachgewiesen werden. Bacillus subtilis blieb wochenlang lebensfähig.

2. Die bakterizide Wirkung der quartären Ammoniumverbindungen als antimikrobiellen Zusätzen in Augentropfen war in den anwendbaren Verdünnungen 1:20 000 bis 1:50 000 gegenüber den meisten Bakterien ausgezeichnet. Sämtliche Testbakterien - darunter 70 verschiedene Pseudomonas aeruginosa-Stämme - wurden im Suspensionsversuch innerhalb 30 Minuten von Benzalkoniumchlorid-Winzer (Tetraseptan WZ), Benzalkoniumchlorid USP und Centrimide abgetötet. Subtilissporen überlebten noch nach 24 Stunden. Als enthemmender Zusatz zur Subkultur wurde Tween 80 (3%) und Lecithin (0,3%) verwandt.

3. Phenylmercuriborat (Merfen WZ) und -nitrat konnten in der verträglichen Verdünnung von 1:50 000 bis 1:100 000 die Testkeime erst innerhalb 5 Stunden abtöten. Sporen von Bacillus subtilis überlebten ebenfalls noch nach 24 Stunden Einwirkungszeit. Optimale Enthemmung in der Subkultur wurde durch Zusatz von 0,5 g/L Cystein und 0,3 g/L Thioglykolsäure zur Nährbouillon und Verdünnung im Verhältnis 1:500 erreicht.

4. Die z. T. mit den vorliegenden nicht übereinstimmenden Ergebnisse anderer Autoren werden vor allem auf Resistenzunterschiede zwischen den Testkeimen zurückgeführt.

5. Gegenüber manchen anderen Keimen hatten die quartären Ammoniumverbindungen keine bakterizide Wirkung. Es wurden gramnegative,

bewegliche, apathogene Stäbchen gefunden, die sich in einer Benzalkoniumchlorid-Winzer-Lösung 1:20 000 wochenlang halten konnten. Die Lösung war zur Herstellung von Augentropfen in einer Apotheke verwandt worden.

6. Wurden die Augentropfen steril in Gebrauch genommen, so erwies sich der Zusatz von Benzalkoniumchlorid-Winzer 1:20 000 als gut wirksam, und die Augentropfen blieben keimfrei. Auch die mit Phenylmercurinitrat (1:100 000) konservierten Augentropfen zeigten beim Gebrauch keine bakteriellen Verunreinigungen.

7. Untersuchungen über die Stabilität der geprüften antimikrobiellen Zusätze bei Filtration, Kochen und Autoklavieren ergaben einen z. T. erheblichen Wirkungsverlust durch Filtrationen, keine Einbuße durch Hitzeeinwirkung.

8. Zur Verhütung bakterieller Verunreinigungen in Augentropfen werden vom Apotheker gewissenhafte aseptische Herstellung und tropfenweises Zugeben eines antimikrobiellen Stoffes zu den fertigen Lösungen gefordert. Quartäre Ammoniumverbindungen stellen gute, aber nicht ideale Konservierungsmittel dar, organische Quecksilberverbindungen sind weniger empfehlenswert. Beim Gebrauch müssen sorgfältig die Regeln der Asepsis beobachtet und der Erfolg der Maßnahmen durch Sterilitätsprüfungen kontrolliert werden.

## D. SCHRIFTTUM


1. ANDERSON, R.A. und STOCK, B.H.: The Bactericidal Effect of Some Ophthalmic Vehicles Australas. J. Pharmacy 39, 466:1110 (1958)

2. BONIN, O., EISSNER, G. und SCHNEIDER, W.: Untersuchungen zur Empfindlichkeit der bakteriellen Sterilitätsprüfungen von Impfstoffen und Sera Paul-Ehrlich-Inst. Ffm. H 56, 65 (1961)

3. BUTLER, T.H.: A Case of Panophthalmitis Caused by Bacillus Subtilis Following a Cataract Extraction Ophthalmoscope 12, 13 (1914) ref. Zbl. Augenhk. 1, 21 (1914)

4. DAMM, H.: Grenzflächenaktive Verbindungen und Mikroorganismen Zbl. Bakt. II. Abt. 109, 349 (1956)

5. DAVIES, G.E., FRANCIS, J., MARTIN, A.R., ROSE, F.L. und SWAIN, G.: 1:6-Di-4-Chlorophenyldiguanidohexane ("Hibitane") - Laboratory Investigation of a New Antibacterial Agent of high Potency Brit. J. Pharmacol. 9, 192 (1954)

6. DOLD, H. und GUST, R.: Über das Vorkommen lebender Bakterien in Desinfektionsmitteln Arch. Hyg. 141, 321 (1957)

7. DOMAGK, G.: Eine neue Klasse von Desinfektionsmitteln Dtsch. Med. Wschr. 61, 829 (1935)

8. DORELLO, U. und D'AMELIO, V.: Sull'azione antibatterica "in vitro" del solfato neutro d'atropina Arch. Ottalm. 57, 119 (1935)

9. ERLANDSON, A.L. jr. und LAWRENCE, C.A. Inactivating Medium for Hexachlorophene (G 11) Types of Compounds and Some Substituted Phenolic Disinfectants Science 118, 274

10. FRIESEN, G.: Rezeptur und Rezepturfehler Pharmaz. Ztg. 91-100 Nr. 41, 1159 (1955)

11. FRITH, M.L. und WRIGHT, S.E.: Preservation of Ophthalmic Solutions Brit. J. Ophthalm. 39, 174 (1955)

12. GOETTSCH, F.J.B.: Sterility of Eyedrops Ophthalmologica 132, 167 (1956)

13. GOTTSACKER, E.: 25 Jahre Zephirol (Beitrag zur chirurgischen Händedesinfektion) Chirurg 29, 245 (1958)

14. GROSSGEBAUER, K.: Die Laboratoriumsdiagnose der Influenza Materia Medica Nordmark 14, 142 (1962)

15. HEICKEN, K. und BELLINGER, H.: Experimentelle Untersuchungen zum Catgutproblem Zbl. Bakt. I Orig. 184, 493 (1962)

16. HELLER, W.M., FOSS, D.N., SHAY, D.E. und ICHNIOWSKI, C.T.: Preservatives in Solutions J. Amer. Pharmaceut. Ass. Pract. Ed. 16, 29 (1955)

17. HESS, H.: Vergleichende Untersuchungen keimtötender Mittel für die pharmazeutische Praxis Schweiz. Apoth. Ztg. 95, 799 (1957)

18. HESS, H. und SPEISER, P.: Comparative Efficacy of Bactericidal Compounds in Buffer Solutions J. Pharmacy. Pharmacol. 11, 650 und 694 (1959)

19. HIND, H.W. und GOYAN, F.M.: A New Concept of the Role of Hydrogen Ion Concentration and Buffer Systems in the Preparation of Ophthalmic Solutions - J. Amer. Pharmaceut. Ass. Sci. Ed. 36, 33 (1947)

20. HIND, H.W. und SZEKELY, G.: Self Sterilizing Ophthalmic Solutions J. Amer. Pharmaceut. Ass. Pract. Ed. 14, 644 (1953)

21. HOPPE-SEYLER/ THIERFELDER: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse Bd. II Bausteine des Tierkörpers, erster Bandteil S. 386 - Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1960

22. JAENICKE, L.: Einkernig-aromatische Verbindungen aus Biochemisches Taschenbuch hrsg. von H.M. Rauen - Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1956 S. 277

23. KEDZIA, W., LEWON, J. und WISNIEWSKI, T.: The Breakdown of Atropine by Bacteria
J. Pharmacy Pharmacol. 13, 614 (1961)

24. KLEBERGER, K.-E. Persönliche Mitteilung

25. KLEIN, M.: Eyedrops and Pyocyanea
Transact. Ophth. Soc. Unit. Kingdom 74, 479 (1954)

26. KLEIN, M., MILWOOD, E. G. und WALTHER, W.W.: On the Maintenance of Sterility in Eyedrops
J. Pharmacy Pharmacol. 6, 725 (1954)

27. KLINGE, K.: Differenzierung der im Wasser vorkommenden Bakterien des Genus Pseudomonas durch die Eigelbreaktion
Arch. Hyg. 141, 348 (1957)

28. KUNDSIN, R.B. und WALTER, C.W.: Investigations on Adsorption of Benzalkonium Chloride USP by Skin, Gloves and Sponges
A. M. A. Arch. Surg. 75, 1036 (1957)

29. KURZWEIL, H.: Höchstthermoresistente Erdsporen als Existenzbasis für Staphylokokken in mineralischen Nährlösungen ohne Stickstoffzusatz
Arch. Hyg. 139, 414 (1955)

30. LAWRENCE, C.A.: An Evaluation of Chemical Preservatives for Ophthalmic Solutions
J. Amer. Pharmaceut. Ass. Sci. Ed. 44, 157 (1955)

31. LAWRENCE, C.A.: Quaternary Ammonium Compounds aus
Antiseptics, Disinfectants, Fungicides, and Chemical and Physical Sterilization hrsg. von G. F. Reddish
Lea & Febiger, Philadelphia, 1957 S. 581

32. LEE, J.C. und FIALKOW, P.J.: Benzalkoniumchloride - Source of Hospital Infection with Gramnegative Bacteria
J. Amer. Med. Ass. 177, 708 (1961)

33. LÖHLEIN, W.: Ein bisher nicht beobachteter Saprophyt als Erreger von Panophthalmie und Ringabszeß der Hornhaut
Arch. Augenhk. 74, 33 (1913)

34. LOWBURY, E.J.L.: Contamination of Centrimide and other Fluids with Pseudomonas pyocyanea
Brit. J. Industr. Med. 8, 22 (1951)

35. LUTZ, A.: Über einige Fälle von ektogener Panophthalmie
Klin. Mbl. Augenhk. 48, 31 (1910)

36. MALIZIA, W.F., GANGAROSA, E.J. und GALEY, A.: Benzalkoniumchlorid as a Source of Infection
N. England J. Med. 263, 802 (1960)

37. McCULLOCH, J.C.: Origin and Pathogenity of Pseudomonas pyocyanea in Conjunctival Sac
A. M. A. Arch. Ophth. 29, 925 (1943)

38. McPHERSON, S.D. jr. und WOOD, R.M.: Self-Sterilizing Ophthalmic Solutions
Amer. J. Ophth. 32, 675 (1949)

39. MIRIMANOFF, A. und CUTTAT, P.A.: Sur la conservation des Collyres
Pharmaceut. acta Helvet. 20, 190 (1945)

40. NEUWALD, F., SOEHRING, K. und KLINGMÜLLER, O.: Solutiones ophthalmicae - Augenarzneilösungen - Vorschlag für die Aufnahme dieses allgemeinen Abschnitts in das Deutsche Arzneibuch 7. Ausgabe
Pharmaz. Ztg. 102, 1037 (1957)

41. ODEBRECHT, W. und RICHTER, J.: Untersuchungen über den Keimgehalt von Arzneigläsern
Pharmazie 16, 612 (1961)

42. OESTERLE, G.: Beitrag zur Pathogenität der aeroben Sporenbildner in der Augenheilkunde
Klin. Mbl. Augenhk. 120, 246 (1952)

43. PHILLIPS, C.R. und WARSHOWSKY, B.: Chemical Disinfectants
Ann. Rev. Microbiol. 12, 525 (1958)

44. QUISNO, R.A., GIBBY, I.W. und FOTER, M.J.: A Neutralizing Medium for Evaluating the Germicidal Potency of the Quaternary Ammonium Salts
Amer. J. Pharmacy 118, 320 (1946)

45. RAHN, O. und ESELTINE, W.P.: Quaternary Ammonium Compounds
Ann. Rev. Microbiol. 1, 173 (1947)

46. RICHTER, G.: Beitrag zum Problem der Sterilisation ophthalmologischer Lösungen
Klin. Mbl. Augenhk. 126, 292 (1955)

47. RIDLEY, F.: Sterile Drops and Solutions in Ophthalmic Practice
Brit. J. Ophthalm. 42, 641 (1958)

48. RIEGELMAN, S., VAUGHAN, D. G. jr. und OKUMOTO, M.:
Rate of Sterilization as a Factor in the Selection of Ophthalmic Solutions
A. M. A. Arch. Ophth. 54, 725 (1955)

49. RIEGELMAN, S., VAUGHAN, D. G. jr. und OKUMOTO, M.:
Antibacterial Agents in Pseudomonas aeruginosa Contaminated Ophthalmic Solutions
J. Amer. Pharmaceut. Ass. Sci. Ed. 45, 93 (1956)

50. RINTELEN, F.:
Infekte durch infizierte Argentum-tannino-albuminat-Lösungen
Ophthalmologica 121, 137 (1951)

51. SCHMID, J.:
Herstellung steriler ophthalmologischer Lösungen
Pharmazie 12, 748 (1957)

52. SCHMIDT, B.:
Die bakterielle Verunreinigung von Arzneimitteln, ihre Bedeutung und Verhütung
Dtsch. Apoth. Ztg. 97, 961 (1957)

53. SCHMIDT, B.:
Bakteriologische Untersuchungen zur Frage der Verwendbarkeit von Polystyrolerzeugnissen in Trinkwasserleitungen
Zbl. Bakt. I Orig. 178, 381 (1960)

54. SCHMIDT, B. und REICHERT, F.:
Experimentelle Untersuchungen über die Verwendbarkeit verschiedener Filtergeräte zur Sterilisation von Arzneimittellösungen in Apotheken
Zschr. Hyg. Infekt. 138, 195 (1953)

55. SILBERSCHMIDT, W.:
Le Bacillus subtilis comme cause de la panophthalmie chez l'homme
Ann. Inst. Pasteur 17, 268 (1903)

56. SOEHRING, K., KLINGMÜLLER, O. und NEUWALD, F.:
Untersuchungen über die Reizwirkung von in wäßrigen Augenarzneilösungen üblichen Zusätzen insbesondere Konservierungsmittel
Arzneimittelforsch. 9, 349 (1959)

57. THEODORE, F. H. und FEINSTEIN, R. R.:
Practical Suggestions for the Preparation and Maintenance of Sterile Ophthalmic Solutions
Amer. J. Ophth. 35, 656 (1952)

58. THOMANN, J. und FUST, B.:
Merfen und Pyrgasol, chemische Zusammensetzung und antiseptische Wirkung
Pharmaceut. acta Helvet. 20, 431 (1945)

59. WHITEHILL, A.: Evaluation of Some Liquid Antiseptics
J. Amer. Pharmaceut. Ass. Sci. Ed.
34, 219 (1945)

60. Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel
Herausgegeben von der Deutschen Gesellschaft für Hygiene
und Mikrobiologie

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1959

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. med. Bernhard Schmidt für die Überlassung des Themas sowie für die freundliche Unterstützung und Betreuung aufrichtig zu danken.

Mein besonderer Dank gilt auch den Herren Dr. med. Volker Lenk und Dr. med. Klaus Großgebauer für ihre wertvollen Hinweise und Ratschläge bei der Durchführung dieser Untersuchungen.

# LEBENSLAUF

Am 2. August 1936 wurde ich als Sohn des Tischlermeisters Ludwig Doll und seiner Ehefrau Katharina, geb. Mertens, in Berlin geboren.

In den Jahren 1942 bis 1946 besuchte ich Volksschulen in Berlin-Wilmersdorf, in Hensken bei Schloßberg/Ostpr. und in Wichstadtl bei Grulich/Sudentengau.

Von 1946 bis 1955 erhielt ich am Canisius-Kolleg in Berlin eine humanistische Schulbildung, die ich 1955 mit der Reifeprüfung abschloß.

Vom Wintersemester 1955/56 bis zum Sommer-Semester 1961 studierte ich Medizin an der Freien Universität Berlin, der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster und der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Das Physikum bestand ich im März 1958, das Staatsexamen im August 1961 an der Freien Universität Berlin.

Vom September 1961 bis Juni 1962 arbeitete ich als Medizinalassistent im Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie an der Freien Universität Berlin.

Photodruck der Photo Copie GmbH.